

## 해바라기씨 단백질에서 plastein의 합성

노재운 · 김재욱

서울대학교 식품공학과

**초록** : 해바라기씨 단백질에서 plastein을 합성 이용하기 위해 먼저 해바라기씨를 pepsin을 이용해 가수분해하는 최적 조건과, plastein을 합성하는 최적 조건을 구하였다. 최적 가수분해 조건은 pH 1.5, 45°C, 2% 기질농도와 2% pepsin 농도에서 24시간 반응시키는 것이었고 plastein 합성의 최적조건은 기질농도 50%, pH 4.5, 50°C, 0.25% pepsin 농도에서 18시간 반응시키는 것이었다. Plastein의 생성을 확인하기 위해 thin layer chromatography를 실시한 결과 해바라기씨 농축가수분해물의 TLC pattern과 plastein의 TLC pattern이 하나의 spot를 제외하고는 다르게 나타났는데 이는 plastein과 기질이 다른 것임을 표시하는 것이었다(1991년 1월 15일 접수, 1991년 3월 25일 수리).

세계 인구가 증가함에 따라 전 세계적으로 식량부족을 유발할 것으로 예상되며 2000년대에는 단백질이 약 2,000만톤 부족할 것이라 한다<sup>1)</sup>. 이 부족량을 해결하기 위한 어떤 기술적인 혁신이 없는 한 이러한 식량부족을 해결하기는 어려울 것이다<sup>2)</sup>. 부족한 단백질 수요를 메우기 위하여 미생물을 배양한 단세포 단백질<sup>3)</sup>의 생산을 비롯하여 어류<sup>4)</sup>, 종래 별로 이용되지 못하던 식물성 단백질<sup>5)</sup> 및 두류 특히 콩의 농축단백질<sup>6)</sup>, 명씨<sup>7)</sup> 및 평지씨<sup>8)</sup> 등의 새로운 단백질원을 식량자원으로 개발하는 노력을 기울이고 있다.

식물성 단백질원 중 해바라기씨는 다른 종실보다 높은 단백질 함량을 가지고 있어, 탈지하여 사료로 이용할 때 영양학적인 면에서 상당한 효과가 있다<sup>9)</sup>. Schwenke<sup>10)</sup>와 Mohammad<sup>11)</sup>은 해바라기씨 단백질의 화학적 성질을 연구하였으며, Rucci와 Bertoni<sup>12)</sup> 및 Masao<sup>13)</sup>는 용매조건을 달리한 해바라기씨 단백질의 추출방법을 조사하였다. Gheysuddin<sup>14)</sup>은 해바라기씨 구형단백질의 일반적인 성질을 조사하였다.

식물성 단백질원에서 얻은 단백질을 효과적으로 이용할 수 있는 방법의 하나로서 그 단백질에서 plastein을 합성하여 이용하는 방법이 있다. 어떤 단백질에서 plastein을 합성하면 원래의 단백질과는 다른 성질을 가지게 되므로 단백질의 물성 개량, 불순물 제거, 아미노산 조성 변화 등의 효과를 기대할 수 있다<sup>15~20)</sup>. 따라서 본 연구에서는 해바라기씨를 선택하

여 그 단백질을 pepsin을 이용하여 가수분해하고 그 가수분해물에서 plastein을 합성 이용하기 위하여 단백질 가수분해 조건, plastein 합성 조건과 plastein의 성질등을 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

##### (1) 단백질 재료

시판 해바라기씨를 40mesh로 분쇄하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

Table 1. Approximate percent composition of sunflower seed

(%)				
Moisture	Protein*	Fat	Carbohydrate	Ash
4.0	20.9	21.8	50.2	3.1

##### (2) 효소 및 시약

Pepsin은 Sigma사 제품(1:1,000, 1,950units/mg solid), TLC plate는 Riedel-deHaen사 제품(DC-plates, precoated SIF20x20 cm, d=0.25 mm), 기타시약은 특급 시약을 사용하였다.

**가수분해 방법**

(1) 가수분해 수율의 정량

해바라기씨 가루에 pepsin을 넣어서 작용시킨 가수분해물 현탁액 25g에 60% TCA 용액 5g을 가하여 전체 TCA농도가 10%가 되게한 것을 3,015g에서 15분간 원심분리후 상등액의 질소를 Kjeldahl법으로 정량하여 다음 식으로 가수분해수율을 계산하였다<sup>29)</sup>.

$$\text{가수분해율(\%)} = \frac{(10\% \text{ TCA 가용성질소})}{(\text{총질소})} \times 100$$

(2) 분해조건

가수분해의 최적 조건을 정하기 위해 pH, 온도, 반응시간, 효소농도, 기질농도 등을 달리하고 일정시간 진탕(55회/분) 반응시킨 후 가수분해 수율을 정량하였다.

① pH : 2% 기질(0.52g)과 기질의 1% pepsin에 6N HCl(pH 0.5), KCl-HCl buffer(pH 1.0, 1.5, 2.0) 또는 citrate-NaOH buffer(pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0)를 첨가하여 반응액이 25g이 되게하여 40°C에서 3시간 반응시켜 가수분해 수율을 정량하였다.

② 온도 : 위와 동일한 조건하에 ①에서 얻은 최적 pH로 하여 30~60°C에서 3시간 반응시킨 후 가수분해 수율을 정량하였다.

③ 반응시간 : 위와 동일한 조건에 ②에서 얻은 최적 온도에서 반응시간을 달리하며 반응시켜 가수분해 수율을 정량하였다.

④ 효소농도 : 위와 동일한 조건에 ③에서 얻은 반응시간으로 하고 효소농도를 0.0625%~4%까지 변화시키면서 반응시켜 가수분해 수율을 정량하였다.

⑤ 기질농도 : 위와 동일한 조건에 ④에서 얻은 최적 효소농도로 하고 기질농도만을 1%~6%까지 변화시키면서 반응시켜 가수분해 수율을 정량하였다.

⑥ 아미노태 질소 : 반응조건을 최적 조건으로 하고 반응시간을 달리하면서 반응시킨 후 (1)과 동일하게 하여 상등액을 취하고, 중화하여 Formol 법으로 아미노태 질소를 정량하였다.

**농축가수분해물 제조**

가수분해 최적 조건하에서 해바라기씨 pepsin으로 가수분해시킨 것에 6N NaOH를 첨가하여 pH 7.0으로 한 후 95°C에서 1시간 진탕하여 pepsin을 실활시켰다. 가수분해물을 3,015g에서 15분간 원심분리하여 상등

액을 모으고 Whatman No.43여과지를 사용해 감압농축하여 plastein 합성에 사용할 농축가수분해물을 제조하였다.

**Plastein 합성 방법**

(1) Plastein 정량

반응액의 반에 해당되는 30% TCA 용액을 첨가해 전체 TCA 농도가 10%가 되게하여 3,015g에서 15분간 원심분리 후 상등액의 질소량을 Kjeldahl법으로 정량하여 다음 식으로 합성률을 계산하였다<sup>29)</sup>.

$$\text{Plastein합성률(\%)} = \frac{(\text{총질소} - 10\% \text{ TCA 가용성질소})}{(\text{총질소})} \times 100$$

(2) 합성조건

합성 최적 조건을 정하기 위해 기질농도, pH, 온도, 반응시간, pepsin 농도등을 달리하면서 실험하였다.

기질농도 : 농축가수분해물 1.5g에 기질의 1% pepsin과 증류수를 첨가하여 기질농도를 30~60%가 되게 하여 40°C에서 3시간 반응시킨 후 plastein 합성률을 정하였다.

pH : 동일한 조건에서 얻은 최적 기질농도로 하고 HCl과 NaOH 용액을 첨가하여 pH를 변화시켰다. 40°C에서 3시간 반응시킨 후 plastein 합성률을 정량하였다.

온도 : 위와 동일 조건에서 얻은 최적 pH가 되게 하고 온도를 30~60°C까지 변화시키면서 반응시킨 후 plastein 합성률을 정량하였다.

시간 : 위와 동일조건에서 얻은 최적 온도로 하여 반응시간을 달리하면서 반응시킨 후 plastein 합성률을 정하였다.

효소농도 : 위와 동일조건에서 얻은 최적 반응시간으로 하여 효소농도를 0.0625~4%까지 변화시키면서 반응시켜 plastein 합성률을 정량하였다.

아미노태 질소 : 최적 반응조건하에서 반응시킨후 (1)과 같이하여 상등액을 취하고, 중화하여 Formol법으로 아미노태 질소를 정량하였다.

**TLC**

TLC plate에 해바라기씨 농축가수분해물과, 그에서 합성된 plastein을 spotting하여 BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O=4:1.5:5(v/v) solvent system으로 1차전개를 하고 BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O=4:1:1(v/v) solvent system으로 2

차전개한 TLC plate를 건조한 후 0.2% ninhydrin acetone용액을 분무하여 80°C에서 10분간 발색시켰다.

(1) 해바라기 농축가수분해물의 TLC pattern

해바라기씨 농축가수분해물을 plastein 합성의 최적 조건으로 반응액을 조제한 후 30% TCA 용액을 반응액의 반이 되게 가하고 증류수를 첨가하여 기질농도가 10%가 되게 희석하였다. 여기서 5 $\mu$ l를 취하여 TLC plate에 spotting하여 전개시켰다.

(2) 해바라기씨 plastein의 TLC pattern

해바라기씨 농축가수분해물을 1.5g 취하여 plastein 합성의 최적 조건으로 반응액을 조제하고 최적 온도에서 18시간 반응시킨 후 30% TCA 용액을 반응액의 반이 되게 가하고 3,015 $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 침전(plastein)을 분리하고 증류수를 첨가하여 초기 반응액의 기질농도가 10%가 되게 희석하였다. 여기서 5 $\mu$ l를 TLC plate에 spotting하여 전개시켰다.

결과 및 고찰

가수분해조건 결정

해바라기씨 가루의 buffer 현탁액에 pepsin을 가하여 각각 다음과 같이 최적 조건을 구하였다.

(1) pH

Pepsin을 첨가한 종자 단백질을 pH를 달리하여 가수분해시킨 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 처음 pH에서 급격히 가수분해 수율이 높아져 pH 1.5에서 최고점을 나타내었다가 pH 4.0까지는 완만하게 감소하여 그 후 크게 떨어졌으며 pH 1.5가 최적 pH였다.

(2) 온도

Pepsin을 첨가한 종자 단백질을 pH 1.5에서 온도를 달리하여 가수분해한 결과는 Fig. 2와 같다. 온도가 상승함에 따라 가수분해 수율이 점차 증가하여 45°C에서 가장 높은 가수분해수율을 나타내었으며 그 이

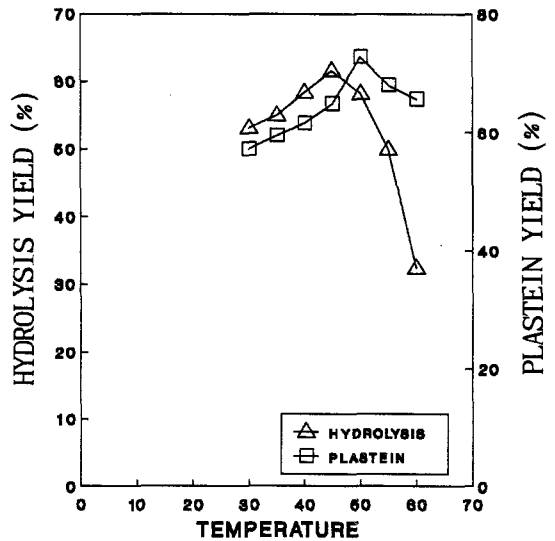
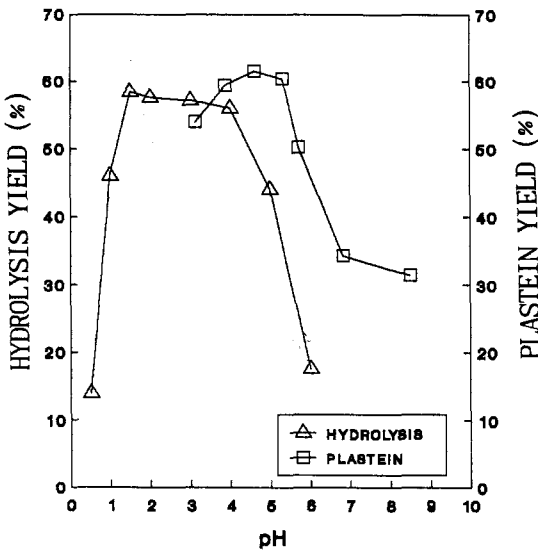


Fig. 1. Effect of pH on hydrolysis of sunflower seed and plastein formation from concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed.

Plastein : 50% substrate

Fig. 2. Effect of temperature on hydrolysate of sunflower seed and plastein formation from concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed.

Hydrolysis : pH 1.5. Plastein : 50% substrate, pH 4.5.

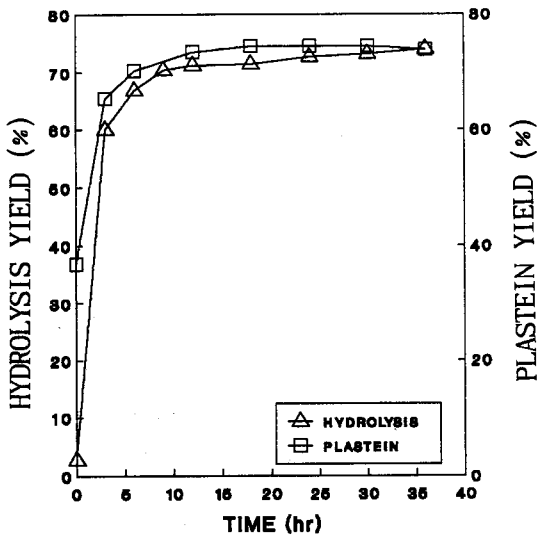


Fig. 3. Effect of time on hydrolysis of sunflower seed and plastein formation from concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed.

Hydrolysis : pH 1.5, 45°C. Plastein : 50% substrate, pH 4.5, 50°C.

후에는 감소하였다. 즉 45°C가 최적 온도였다.

(3) 가수분해시간

Pepsin을 첨가한 종자 단백질을 pH 1.5, 45°C에서 시간을 달리하면서 가수분해한 결과는 Fig. 3과 같다. 가수분해 초기에 가수분해 수율이 급격히 증가하였으며 6시간후에는 아주 완만하게 증가하여 24시간이후에는 가수분해 수율이 거의 일정하게 나타났다. 따라서 24시간을 최적 가수분해시간으로 선택하였다.

(4) 효소농도

Pepsin을 첨가한 종자 단백질을 pH 1.5, 45°C에서 기질에 대한 pepsin의 첨가량을 달리하고 24시간 가수분해한 결과는 Fig. 4와 같다. Pepsin농도가 증가함에 따라 전체적으로 가수분해가 급격하게 진행되어 기질의 2% pepsin을 가할 때까지는 가수분해 수율이 현저히 증가되었으며 2% 이후에서는 pepsin양에 비하여 가수분해 수율이 그다지 증가하지 않았다. 따라서 2% pepsin이 적당하다고 판단되었다.

(5) 기질농도

Pepsin을 첨가한 종자 단백질을 pH 1.5, 45°C에서 기질의 첨가량을 달리하고 기질의 2% pepsin을 가하여

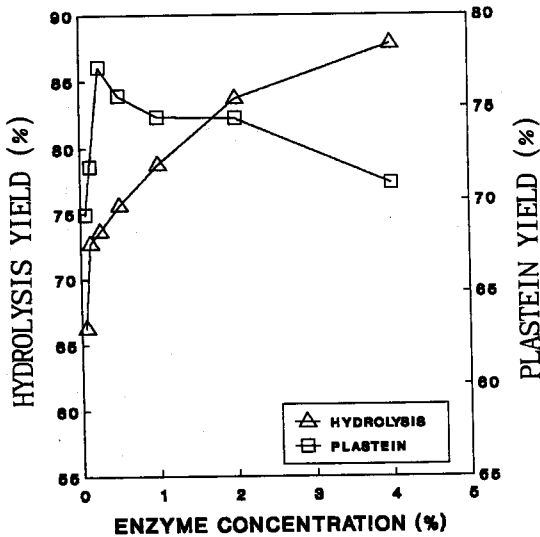


Fig. 4. Effect of enzyme concentration on hydrolysis of sunflower seed and plastein formation from concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed.

Hydrolysis : pH 1.5, 45°C, 24hr. Plastein : 50% substrate, pH 4.5, 50°C, 18hr.

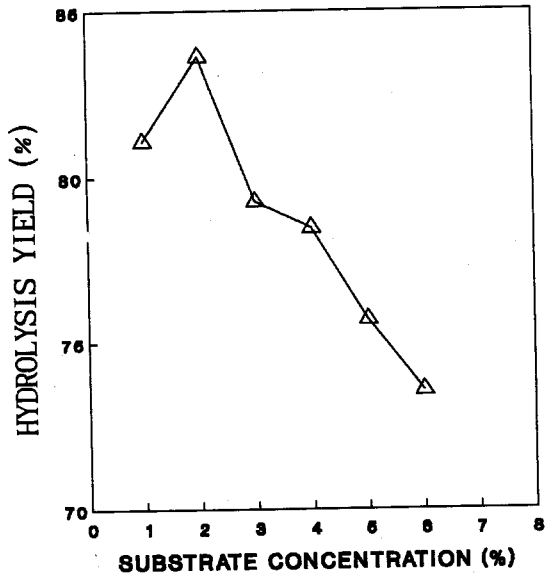


Fig. 5. Effect of substrate concentration on hydrolysis of sunflower seed.

pH 1.5, 45°C, 24hr, 2% enzyme concentration.

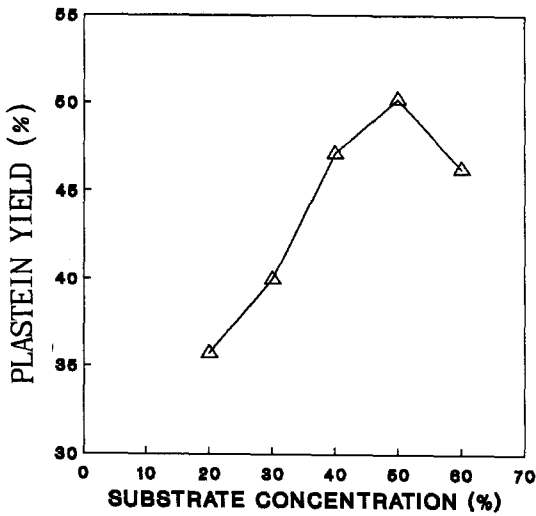


Fig. 6. Effect of substrate concentration on plastein formation from concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed.

50% substrate, pH 4.5, 50°C, 18hr, 0.25% pepsin.

Table 2. Composition of concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed

(%)				
Moisture	Protein*	Fat	Carbohydrate	Ash
22.2	25.0	0.4	45.0	7.4

\*Nitrogen conversion factor = 5.4.

24시간 가수분해한 결과는 Fig. 5와 같다. 2% 기질농도에서 최대의 가수분해 수율을 나타내었고 기질농도 증가시 수율이 점차로 감소하였다. 즉 2% 기질농도가 최적 기질농도였다.

(6) 아미노태 질소

Pepsin을 첨가한 종자 단백질을 가수분해의 최적 조건(pH 1.5, 45°C, 24시간, 2% pepsin, 2% 기질)에서 시간을 달리하면서 가수분해후 아미노태 질소를 정량한 결과는 Fig. 6과 같다. 가수분해 초기에 아미노태 질소 양이 급격히 증가하였고 12시간 이후에는 일정하였다. 즉 가수분해가 진행됨에 따라 가용성 peptide나 아미노산 등이 증가하고 있다는 것을 알 수 있었다.

해바라기씨 농축가수분해물 제조

가수분해의 최적 조건에서 가수분해시킨 후 pH 7.0으로 중화시키고 70°C에서 감압농축한 것의 일반성분은 Table 2와 같았다.

Plastein 합성조건

최적 plastein 합성조건을 알기 위하여 해바라기씨 농축가수분해물에 pepsin을 첨가하고 다음과 같이 각각의 최적 합성조건을 구하였다.

(1) 기질농도

기질농도를 달리하고, 기질의 1% pepsin을 첨가해 pH 5.7, 40°C에서 3시간 반응시킨 결과는 Fig. 6과 같다. 기질농도가 증가함에 따라 합성률이 점차 많아져 50% 기질농도에서 plastein 합성률이 높으나 그 이상에서는 합성률이 감소하였다. 즉 50% 기질농도가 최적 기질농도였다.

(2) pH

50% 기질에 기질의 1% pepsin을 첨가하고 pH를 달리하면서 40°C에서 3시간 반응시킨 결과는 Fig. 1과 같다. pH가 증가함에 따라 합성률이 증가하여 pH 4.5에서 plastein 합성률이 최대로 나타났으므로 최적 pH는 4.5이었다.

(3) 온도

위와 동일 조건에 pH 4.5로 하여 온도를 변화시키면서 반응시킨 결과는 Fig. 2와 같다. 온도가 증가함에 따라 합성률이 많아져 50°C에서 합성률이 최대로 나타났으나, 온도변화에 따른 합성률의 변화는 다른 조건 변화에 비하여 그다지 크지 않았다. 즉 50°C가 최적 온도였다.

(4) 시간

위와 동일 조건에서 50°C로 하여 시간을 달리하면서 반응시킨 결과는 Fig. 3과 같다. 반응 초기에 합성이 급격하게 일어났으며 18시간 이후 plastein 합성률이 일정하였다. 따라서 최적 반응시간으로 18시간을 선택하였다.

(5) 효소농도

위와 동일 조건에서 pepsin농도를 달리하여 반응시킨 결과는 Fig. 4와 같다. 첨가 pepsin양이 증가할수록 합성률이 증가하여 0.25%의 pepsin을 첨가하였을 때 77.23%로 최대의 plastein을 합성률을 나타내었으며 pepsin농도가 그보다 증가함에 따라 합성률이 오히려 점차로 감소하였다. 즉 0.25% pepsin 농도가 최적 농도였다.

(6) 아미노태 질소

합성의 최적 조건(50% 기질, pH 4.5, 50°C, 18시간, 0.25% pepsin)에서 반응시킨 결과는 Fig. 7과 같다. 반응이 진행됨에 따라 반응액의 아미노태 질소가 점차로 감소하여 18시간 이거의 일정하였는데 이는 합성이

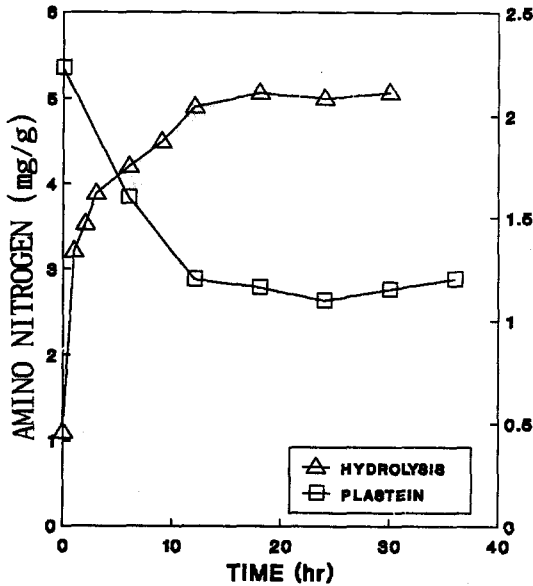


Fig. 7. Changes of amino nitrogen concentration during hydrolysis of sunflower and plastein formation from concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed.

Hydrolysis : pH 1.5, 45°C, 24hr, 2% pepsin, 2% substrate.

Plastein : 50% substrate, pH 4.5, 50°C, 18hr, 0.25% pepsin.

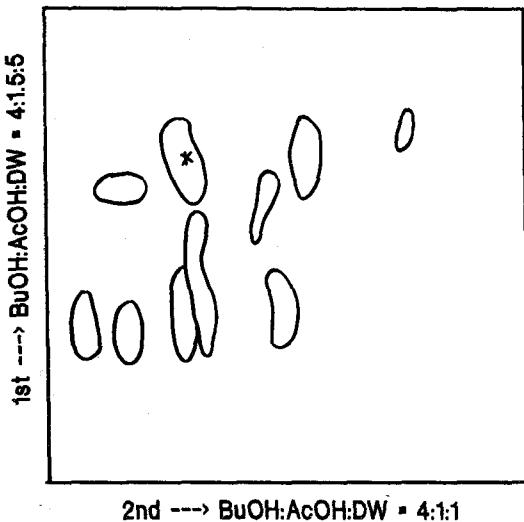


Fig. 8. Thin layer chromatogram of concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed

점차로 감소하여 18시간 이후 거의 일정하였는데 이는 합성이 진행됨에 따라 반응액중의 peptide나 아미노산

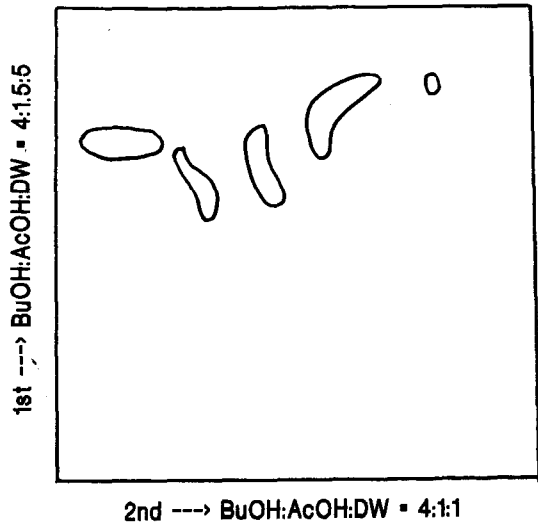


Fig. 9. Thin layer chromatogram of sunflower seed plastein

등이 plastein 합성에 사용되어진 결과로 생각되진다.

### TLC

Plastein과 그의 합성에 사용된 기질간의 특성차이를 알아보기 위하여 농축가수분해물과 그에서 합성된 plastein의 TLC pattern을 서로 비교하였다. 해바라기씨 plastein 합성의 최적 조건으로 하여 plastein 반응을 하기전의 조제액으로 TLC를 실시한 결과는 Fig. 8과 같고, 이 조제액을 18시간 반응시킨후 원심분리하여 plastein을 얻어 TLC를 실시한 결과는 Fig. 9와 같다. 즉 plastein 반응전의 액에서 10개의 spot가 나타났고 반응후 plastein에서는 5개의 spot가 나타났다. 별도로 pepsin의 TLC pattern을 확인하기 위해 기질인 농축가수분해물을 첨가하지 않고 pepsin만을 첨가하여 해바라기씨 plastein 합성의 최적 조건으로 반응액을 조제하고 TLC를 실시한 결과 확인할 수 있는 spot가 나타나지 않았으므로 Fig. 8과 Fig. 9에서 나타난 spot들은 농축가수분해물과 그 plastein에서 나온 것임을 알 수 있었다. 즉 반응후, Fig. 9에서는 Fig. 8에 존재하던 spot들 중 1개(\*)를 제외한 나머지 spot들이 사라지거나 변하여 새로운 spot가 나타났는데 이는 합성이 진행됨에 따라 Fig. 8에 존재하던 spot들이 plastein 합성에 사용되어 새로운 spot를 형성한 결과로 생각되어진다. 즉 plastein은 이의 합성에 사용된 기질과는 다른 물질임을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Wells, J. : UNIDO Expert Group Meeting, Vienna Oct., 2(1973)
2. Simatov, A. : Food proteins : World supply and demand of food proteins, eds. by P.F. Fox and J.J. Condon, Applied Sci. Pub., London and New York (1982)
3. Feeny, R. : Food proteins : Improvement through chemical and enzymatic modification, eds. by Whitaker J., Advances in Chem. Series, p.160, American Chemical Society, Whashington D.C.(1977)
4. Miller, R. and H.S.Jr. Groninger : J. Food Sci., 41 : 268(1976)
5. Damodaran, S. and J.E. Kinsella : J. Biol. Chem., 255 : 8503(1980)
6. Brinegar, A.C. and J.E. Kinsella : J. Agric Food Chem., 28 : 818(1980)
7. Choi, Y.R., E.W. Lusas and K.C. Rhea : J. Food Sci., 46 : 954(1981)
8. Gill, T.A. and N.A. Tung : J. Food Sci., 43 : 1481 (1981)
9. Morrison, A.B. and J.B. Campbell : J. Nutr., 70 : 112(1962)
10. Schwenke, D. K. : Chem. Abstr., 81 : 62421u(1974)
11. Mohammad, A., M.A. Sabir, F.W. Sosulski and S.L. MacKenzie : J. Agr. Food Chem., 21(6) : 988 (1973)
12. Rucci, A.O. and M.H. Bertoni : Chem. Abstr., 80 : 69365s(1974)
13. Mosao, S. : Chem. Abstr., 80 : 121992b(1975)
14. Gheyasuddin, S., C.M. Cater and K.F. Mattil : J. Food Sci., 35 : 453(1970)
15. Yamashita, M., S. Arai and M. Gonda : Agr. Biol Chem., 34(9) : 1333(1970)
16. Aso, K., M. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki : Agr. Biol. Chem., 38(3) : 679(1974)
17. Hofstein, B. and G. Lalasidis : J. Agric. Food Chem., 24(3) : 460(1976)
18. Yamashita, M., S. Arai and M. Fujimaki : J. Agric. Food Chem., 24(6) : 1100(1976)
19. Manti, J.C. and R. Jost : J. Agric. Food Chem., 27 (6) : 1281(1976)
20. Edwards, J.H. and W.F. Shipe : J. Food Sci., 43 : 1215(1978)

## Plastein formation from sunflower seed protein

Jae-Mun Rho and Ze-Uook Kim(Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon, Korea)

**Abstract** : Optimum conditions for hydrolysis of sunflower seed by pepsin and for plastein formation by pepsin were determined. The optimum conditions for hydrolysis of sunflower seed were pH 1.5, 45°C, enzyme concentration 2%, substrate concentration 2%, and hydrolysis time 24hr. The optimum conditions for sunflower seed-plastein formation were 50% substrate, pH 4.5, 50°C, 0.25% pepsin and 18hrs reaction time. To verify plastein fromation from concentrated prptic hydrolysate of sunflower seed, thin layer chromatography was performed. The TLC pattern of concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed was different from that of its plastein. The TLC pattern of concentrated peptic hydrolysate of sunflower seed and that of its plastein indicated that plastein was different material from the hydrolysate.